

————— *Artículo original* —————

**Complejos de inclusión de harmano con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Aspectos metodológicos relativos a su caracterización analítica \***

ANDRÉS LEÓN LEAL, LAURA MARTÍN CARBAJO,  
ANA ISABEL OLIVES BARBA, MARÍA ANTONIA MARTÍN  
CARMONA y BENITO DEL CASTILLO GARCÍA

*Laboratorio de Técnicas Instrumentales, S. D. de Química Analítica.  
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.  
28040 Madrid*

**RESUMEN**

Se han obtenido y caracterizado los complejos de inclusión de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) con un alcaloide derivado de  $\beta$ -carbolina: el harmano. El harmano presenta una notable fluorescencia nativa y dicha fluorescencia es dependiente del pH del medio. La formación de complejos de inclusión con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina permite observar la emisión de fluorescencia correspondiente a la forma neutra de harmano. Este comportamiento es inusual especialmente en disolución acuosa. La caracterización de los complejos de inclusión de estos compuestos mediante espectrofotometría UV-VIS o espectrofluorimetría presenta dificultades debido a la presencia de las distintas especies absorbentes o emisoras. La separación del harmano incluido, con respecto al harmano no incluido, puede realizarse mediante filtración o diálisis de equilibrio. Ambos procesos conducen a resultados cuantitativos mejores que cuando se evitan estos procedimientos. En el intervalo de concentraciones de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina estudiado (de  $1 \times 10^{-3}$  M a  $2 \times 10^{-2}$  M) se puede apreciar que el proceso de inclusión se ve favorecido al aumentar la concentración de ciclodextrina.

**Palabras clave:** Complejos de inclusión.— Fluorimetría.— Diálisis de equilibrio.

---

\* Premio Carlos del Castillo Leiva 2002, de la Real Academia Nacional de Farmacia.

**ABSTRACT****Harmane/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes.  
Methodology for its analytical characterization**

The inclusion complexes between hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) and harmane have been obtained. Harmane is a  $\beta$ -carboline derivative which exhibits notable native fluorescence pH dependant. When the inclusion complexes between hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and harmane are produced it is possible to observe the fluorescence emission corresponding to the neutral form of harmane. This is a particular behaviour of harmane in aqueous solution. The characterization of the inclusion complexes of this guest molecule by UV-VIS spectrophotometry or spectrofluorimetry is difficult due to the coexistence of different species in ground and excited states. The separation of the inclusion complexes from the free harmane present in the solution can be carried out by filtration or equilibrium dialysis process. Both experimental procedures lead to quantitative results better than when these procedures are avoided. For the concentration range studied for hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (from  $1 \times 10^{-3}$  M to  $2 \times 10^{-2}$  M) the inclusion process is favoured with increasing concentration of cyclodextrin.

**Key-words:** Inclusion complexes.— Fluorimetry.— Equilibrium dialysis.

**INTRODUCCIÓN**

El origen de la presencia de los alcaloides derivados de  $\beta$ -carbolina originados de forma endógena en los mamíferos (1), entre ellos el hombre, por el momento no está claro. Sin embargo, se sabe que su concentración en orina humana (2) así como en los tejidos de rata se incrementa como consecuencia del consumo de alcohol (3). Los alcaloides del harmano, los cuales pueden considerarse derivados de la estructura de  $\beta$ -carbolina, están muy difundidos en la naturaleza, y presentan una amplia variedad de actividades farmacológicas, desde alucinógenos o hipotensivos hasta actividad antimicrobiana, así como inhibidores de la agregación plaquetaria (4), debido a su papel en el metabolismo del ácido araquidónico. Entre otras cabe citarse su actividad mutagénica (5, 6) comportándose como agentes cancerígenos semejantes a la anilina o la *o*-toluidina.

La capacidad de formar complejos de inclusión, ya sea en estado sólido o en disolución, es una de las principales características de las ciclodextrinas (7). La inclusión tiene lugar gracias a que las moléculas

las huésped quedan atrapadas en el interior de la cavidad, siendo estable el aducto formado, gracias a la estructura anular característica de las ciclodextrinas. La formación de complejos con ciclodextrinas (CDs) tiene como finalidad lograr la mejora de la solubilidad y de las características organolépticas de numerosos principios activos, así como la de facilitar la absorción y liberación de los mismos. Se ha demostrado que los complejos con ciclodextrinas en disolución son química y fotoquímicamente más estables que los correspondientes compuestos no incluidos. En este sentido, el complejo vitamina K<sub>3</sub>/β-CD es mucho más estable frente a la luz en disolución ácida o neutra que la propia vitamina K<sub>3</sub> (8). Igualmente, tanto el retinol como el retinal y el ácido retinóico son fotolábiles mientras que los complejos de inclusión con diversas CDs los hacen resistentes a la luz (9) y la oxidación. Este incremento en la estabilidad se ha observado asimismo para la aspirina (10), el nitracepan (11), algunos antiinflamatorios (12), el metronidazol (13), ciertos antibióticos (14) y otros fármacos.

Debido a la existencia de diferentes equilibrios ácido-base tanto en estado fundamental como en estado excitado para los alcaloides derivados de β-carbolina, resulta difícil caracterizar los complejos de inclusión con ciclodextrinas. Por ello, en el presente trabajo se describen las ventajas derivadas del empleo de una metodología sencilla para la caracterización analítica de los complejos de inclusión de harmano con hidroxipropil-β-ciclodextrina. Así pues, la diálisis de equilibrio permite diferenciar en un mismo ensayo el harmano libre del complejo de inclusión basándonos en las peculiaridades espectrofluorimétricas de las formas catiónicas y neutras de estas especies, que sólo son detectables mediante espectrofluorimetría.

## EXPERIMENTAL

### Aparatos y reactivos

Los espectros de excitación y emisión fluorescente se obtuvieron con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo MPF-2A (lámpara de xenon de 150 W). En todas las determinaciones se utilizaron cubetas de 1 cm de paso óptico. La formación de los complejos de

inclusión y el posterior proceso de diálisis requirió un multiagitador magnético de la firma comercial SBS.

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de la máxima garantía y calidad para análisis. El agua empleada en los diferentes experimentos fue bidestilada. El harmano fue adquirido a la casa comercial Sigma y la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina fue donada generosamente por los laboratorios Rhône-Poulenc (Francia). Los tensioactivos empleados: SDS (n-dodecilsulfato de sodio), CTAB (bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio), Brij-35 (polioxietileno-23-lauril éter) fueron adquiridos a la casa comercial Merck. En la preparación de los complejos de inclusión se utilizaron las disoluciones acuosas de HP- $\beta$ -CD en concentración  $1,0 \times 10^{-2}$  M. Las soluciones de los tensioactivos utilizados se prepararon en concentraciones cuatro veces superiores a las concentraciones micelares críticas (CMC) de cada uno de los tensioactivos. La concentración de harmano, tanto en las disoluciones micelares como en las disoluciones de ciclodextrina, fue  $1,0 \times 10^{-6}$  M.

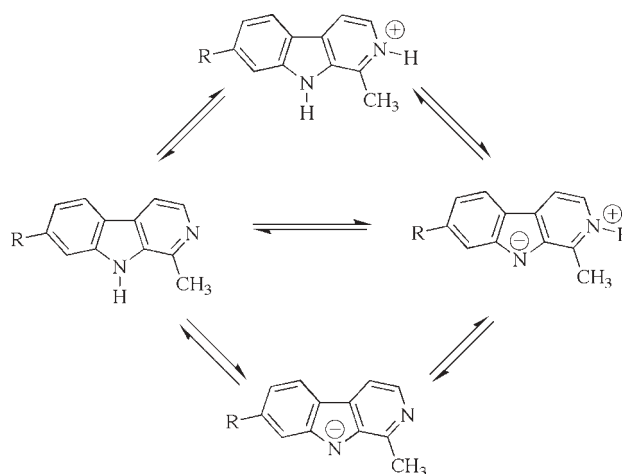
### Metodología

Los complejos de inclusión fueron obtenidos mediante la formación de una película (15) del sustrato a incluir. Para ello, se preparó una disolución madre etanólica de harmano y se tomaron alícuotas de la misma de 10 ó 20  $\mu$ L y se depositaron en un matraz de fondo redondo. A continuación se evaporó el disolvente por aplicación de vacío a temperatura ambiente quedando formada una fina película sobre las paredes del matraz. A continuación se añadieron 10 mL de la disolución acuosa de ciclodextrina de concentración  $1,0 \times 10^{-2}$  M; este sistema se mantuvo en agitación magnética continua durante 24 horas. Se registraron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de las disoluciones de los complejos de inclusión, así obtenidos tras 24 horas en agitación magnética. Asimismo, las disoluciones de estos complejos fueron sometidas a un proceso de diálisis de equilibrio para separar el harmano libre del harmano incluido en la cavidad de la ciclodextrina. Transcurridas 24 horas en diálisis se obtuvieron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia tanto de los líquidos del interior de la membrana de diálisis como de los líquidos exteriores que contienen en disolución los solutos dializados.

Las disoluciones de los tensioactivos fueron preparadas y estabilizadas durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron sobre la película de harmano obtenida de forma análoga a lo anteriormente descrito para los complejos de inclusión con ciclodextrinas y posteriormente se mantuvieron dos horas en agitación magnética. Seguidamente se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente de las disoluciones así obtenidas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La existencia de complejos de inclusión puede ponerse de manifiesto de muy diversas maneras, desde un incremento en la solubilidad acuosa de los compuestos incluidos hasta notables cambios en propiedades espectroscópicas y cromatográficas. En el caso de los complejos de inclusión de harmano e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina se pueden apreciar cambios notables en los espectros de emisión fluorescente como consecuencia del proceso de inclusión. Así, en disolución acuosa sólo es posible observar la emisión fluorescente del harmano correspondiente a la forma catiónica (Esquema 1), debido a que la protonación del nitrógeno piridínico del anillo de  $\beta$ -carbolina es mucho más rápida que la desactivación del estado excitado por fluorescencia.



ESQUEMA 1. *Diferentes especies implicadas en los equilibrios de transferencia de protón del harmano. Formas: catiónica, neutra, ion dipolar y aniónica.*

Esta reacción de transferencia de protón transcurre rápidamente en disolución acuosa, en consecuencia, en condiciones de pH superiores al  $pK_a$  del harmano (7,34) (16) la especie existente en estado fundamental será la forma neutra o la correspondiente al ion dipolar dependiendo de la naturaleza del disolvente (alcoholes o agua). Sin embargo, cuando estas disoluciones acuosas se irradian, las moléculas de harmano pasan a estado excitado y se produce la reacción de transferencia de protón durante el tiempo de vida del estado excitado, lo que provoca la emisión correspondiente de las formas catiónicas, aún cuando las especies en estado fundamental (previamente a la irradiación) fueran las formas neutras. En disoluciones acuosas de ciclodextrinas se pueden observar las bandas de emisión correspondientes a la forma neutra junto con la catiónica. Este comportamiento se puede apreciar en la Figura 1, donde se muestra la coincidencia de los máximos de emisión del complejo de inclusión con los obtenidos en disolución etanólica correspondientes a la forma neutra del harmano.

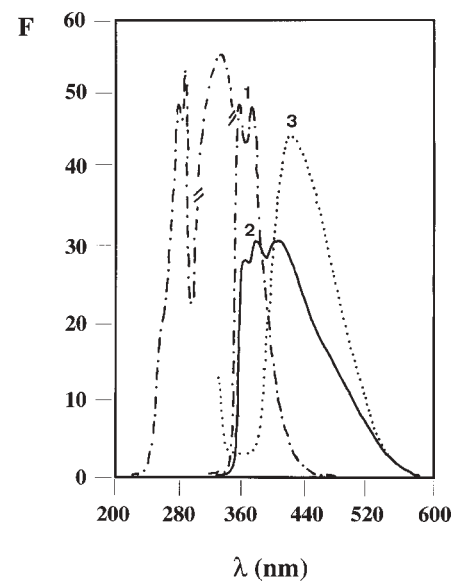


FIGURA 1. Espectros de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$ ) de: **1.** Harmano ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) en disolución etanólica. **2.** Disolución acuosa del complejo de inclusión de harmano ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina ( $c = 1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) obtenidos en disolución acuosa tamponada a pH = 7,8. **3.** De harmano ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) disolución acuosa tamponada a pH = 7,8. **F:** fluorescencia en unidades arbitrarias,  $\lambda$ : longitud de onda en nanómetros.

Asimismo, también se aprecia la emisión correspondiente al catión, que está presente en disolución acuosa de ciclodextrina; si bien, comparada con la disolución acuosa tamponada, se produce un ligero desplazamiento en el máximo de emisión fluorescente correspondiente a la forma catiónica, por lo que puede deducirse que el citado

alcaloide debe hallarse incluido o parcialmente incluido. El perfil del espectro de emisión puede explicarse considerando que la cavidad de la ciclodextrina proporciona un microentorno con una polaridad semejante a la que presentan disolventes como los alcoholes (etanol o metanol), tal y como ya se ha descrito para otros complejos de inclusión (17, 18). En la Tabla 1 se resumen las características espectrofluorimétricas del harmano en diferentes entornos y a distintos valores de pH, demostrándose que la inclusión en la cavidad de las ciclodextrinas o la solubilización por diversos agentes tensioactivos afecta notablemente al comportamiento espectroscópico y a los equilibrios de transferencia protónica del harmano.

Tabla 1. Características espectrofluorimétricas de las distintas especies de harmano en diferentes disolventes y microentornos (micelas y ciclodextrinas). El pH al que se detecta cada máximo de fluorescencia aparece entre paréntesis.  $\lambda_{em}$ : longitud de onda del máximo de emisión en nanómetros.

	CATION	NEUTRO	ION DIPOLAR	ANIÓN
MEDIO	$\lambda_{em}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
Acuoso *	434 (pH=0-9)	380 (pH=10-14)	491 (pH=10-14)	440 (pH>14)
Etanol	430 (pH=1,0)	366,380 (pH=13,0)	480 (pH=13,0)	—
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	430 (pH=1,0)	366,380 (pH=13,0)	480 (pH=13,0)	—
Bromuro de cetiltrimetil- amonio (CTAB)	430 (pH=1,0)	—	—	426,450 (pH=13,0)
Polioxietileno-23-lauril-éter (Brij-35)	430 (pH=1,0)	366,380 (pH=13,0)	480 (pH=13,0)	—
$\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD)	430 (pH=1,0)	360,380 (pH=7,8)	485 (pH=13,1)	—
Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD)	430 (pH=1,0)	362,380 (pH=7,8)	—	420,450 (pH=13,1)
Dimetil- $\beta$ -ciclodextrina (DM- $\beta$ -CD)	430 (pH=1,0)	362,380 (pH=7,8)	—	420,450 (pH=13,1)
Trimetil- $\beta$ -ciclodextrina (TM- $\beta$ -CD)	430 (pH=1,0)	362,380 (pH=7,8)	480 (pH=13,1)	—

\* Datos tomados de referencia 16.

La existencia de diferentes especies en estado excitado (neutra y catiónica) para los complejos de inclusión de harmano e HP- $\beta$ -CD dificulta la determinación de los parámetros utilizados en la caracterización de los complejos de inclusión con ciclodextrinas; tal es el caso de la determinación de los valores de las constantes de asociación o la estequiometría de los mismos. Dado que no es adecuado desplazar el equilibrio completamente hacia la forma catiónica, ya que ello contribuye a dificultar la inclusión, se hace necesario la búsqueda de otras metodologías alternativas que permitan superar esta dificultad.

Entre las metodologías alternativas, nos decidimos por aquellas que presenten una menor dificultad, accesibilidad y, a la vez, buenas características en cuanto a la reproducibilidad de los resultados cuantitativos se refiere. En un primer paso se procedió a la filtración de las disoluciones de los complejos de inclusión a través de un sistema de filtración de Millipore con filtros de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Dado que los complejos de inclusión formados deben resultar más hidrosolubles que los sustratos a incluir, este procedimiento constituye una opción para separar el harmano libre y no solubilizado del harmano incluido y, por tanto, solubilizado. Se observó que el harmano libre es lo suficientemente soluble en la disolución tampón acuosa al nivel de concentración de  $1,0 \times 10^{-6}$  M empleado para la determinación espectrofluorimétrica, puesto que el harmano libre originaba una intensa banda de emisión fluorescente correspondiente a la forma catiónica que interfería las determinaciones cuantitativas. Este procedimiento, que había dado buenos resultados en el caso de los complejos de inclusión con el carbazol (19) y la elipticina (20), fue descartado para el caso de los complejos de inclusión con harmano. Por ello, se decidió realizar la separación mediante un proceso de diálisis de equilibrio, en el que las formas libres del harmano difundan desde el interior al exterior de la membrana de diálisis debido a su bajo peso molecular. Por el contrario, los complejos de inclusión harmano/HP- $\beta$ -CD, cuyo peso molecular es de 7 a 8 veces superior al del harmano, no podrán difundir desde el interior al exterior de la membrana. De esta manera, se puede lograr la separación del harmano incluido con respecto al harmano no incluido.

Cuando se comparan los espectros de emisión de fluorescencia de las disoluciones sin dializar (Figuras 2 y 3), se puede apreciar la



emisión mayoritaria de las formas catiónicas, especialmente a bajas concentraciones de ciclodextrina.

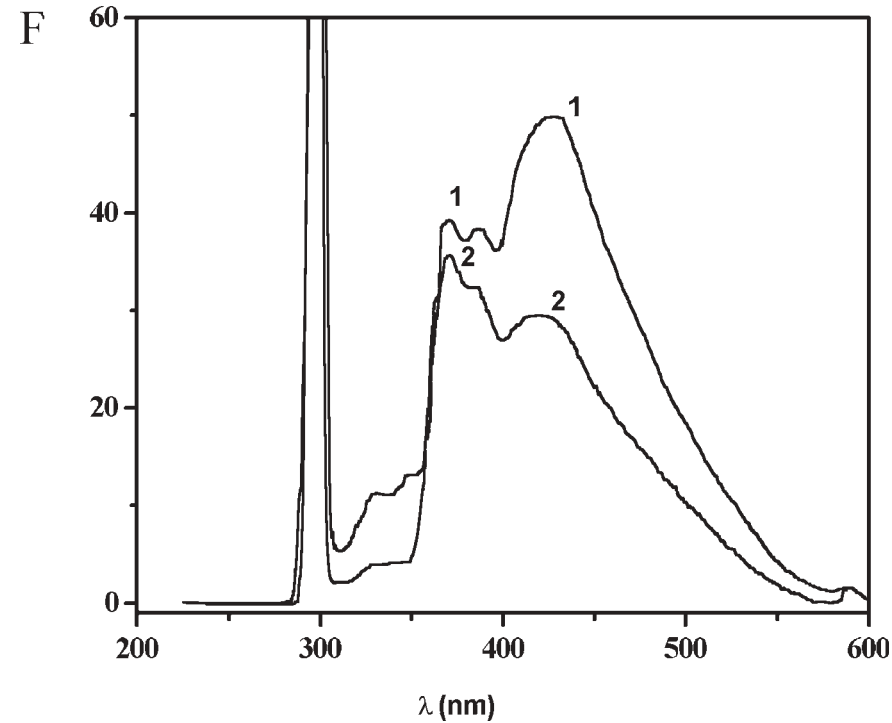


FIGURA 2. Espectros de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ) de los complejos de inclusión de harmano ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina ( $c = 5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) obtenidos en disolución acuosa tamponada a  $\text{pH} = 7,8$ : **1.** Disolución no dializada. **2.** Disolución medida después de 24 horas de diálisis de equilibrio. **F:** fluorescencia en unidades arbitrarias,  **$\lambda$ :** longitud de onda en nanómetros.

Este comportamiento se explica teniendo en cuenta que en la disolución coexisten las formas libres del harmano (protonadas), que emiten a 430 nm, con las formas neutras incluidas en la HP- $\beta$ -CD, que son responsables de la banda de emisión, con máximos a 360 y 380 nm. Si se considera que el rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia es aproximadamente diez veces superior para las formas catiónicas que para las formas neutras, se explica que, aún cuando las concentraciones relativas de harmano libre y de

harmano incluido sean similares (en el caso de los complejos con una concentración de ciclodextrina de  $5,0 \times 10^{-3}$  M, Figura 2), la intensidad de emisión a 430 nm sea superior a la intensidad de emisión a 360-380 nm. Sin embargo, una vez desarrollado el proceso de diálisis, cuando se registran los espectros de emisión de fluorescencia de los líquidos del interior de la membrana de diálisis, donde después de este proceso permanecen los complejos de inclusión pero no el harmano libre, se observa (Figuras 2 y 3) un aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia a 360-380 nm con respecto a la banda de 430 nm. Este aumento es tanto más significativo cuanto mayor es la concentración de ciclodextrina en la disolución. En la Tabla 2 se resume este comportamiento.

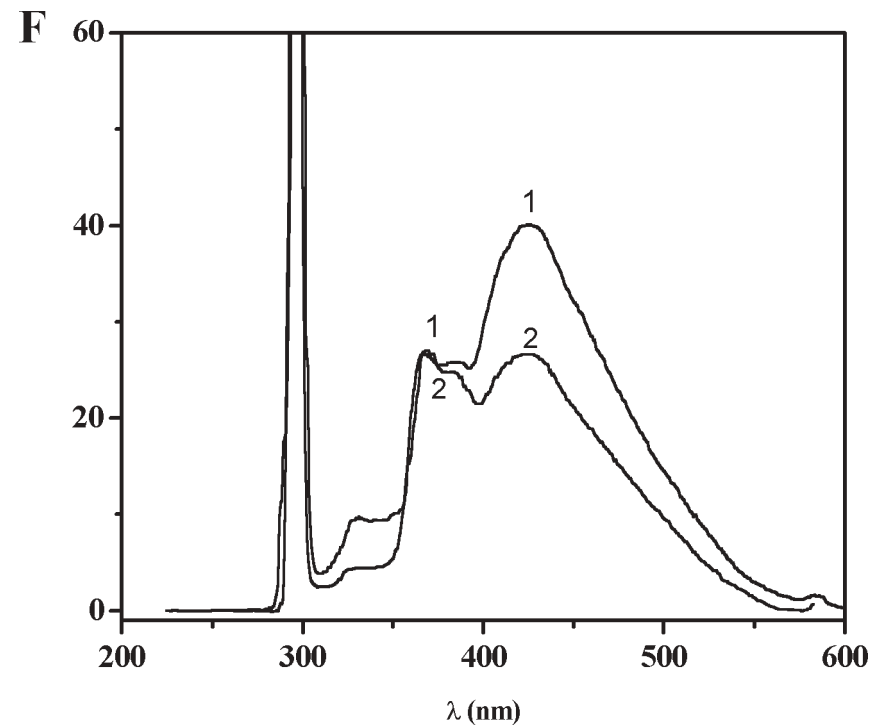


FIGURA 3. Espectros de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{ex} = 290$  nm) de los complejos de inclusión de harmano ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  M) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina ( $c = 9,0 \times 10^{-3}$  M) obtenidos en disolución acuosa tamponada a pH = 7,8: **1**. Disolución no dializada, **2**. Disolución medida después de 24 horas de diálisis de equilibrio. **F**: fluorescencia en unidades arbitrarias,  **$\lambda$** : longitud de onda en nanómetros.

TABLA 2. *Influencia del proceso de diálisis sobre la fluorescencia de los complejos de inclusión obtenidos para concentraciones crecientes de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD)*

*Comparación de las intensidades de emisión de fluorescencia de los complejos de inclusión obtenidos para concentraciones crecientes de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) en función del proceso de diálisis*

	DISOLUCIONES NO DIALIZADAS	DISOLUCIONES DIALIZADAS
CONCENTRACIÓN DE HP- $\beta$ -CD (M)	SF <sub>370</sub> /SF <sub>430</sub>	SF <sub>370</sub> /SF <sub>430</sub>
$1,0 \times 10^{-3}$	0,421	0,551
$2,0 \times 10^{-3}$	0,455	3,000
$3,0 \times 10^{-3}$	0,541	0,809
$4,0 \times 10^{-3}$	0,594	2,083
$5,0 \times 10^{-3}$	0,700	1,060
$6,0 \times 10^{-3}$	0,687	2,000
$7,0 \times 10^{-3}$	0,750	1,101
$8,0 \times 10^{-3}$	0,772	1,600
$9,0 \times 10^{-3}$	0,788	1,200
$1,0 \times 10^{-2}$	0,798	1,700

SF<sub>370</sub>: Señal de fluorescencia (en unidades arbitrarias) a la longitud de onda de emisión de 370 nm correspondiente a la forma neutra del harmano.

SF<sub>430</sub>: Señal de fluorescencia (en unidades arbitrarias) a la longitud de onda de emisión de 430 nm correspondiente a la forma catiónica del harmano.

Así, cuando se compara la relación de intensidades de emisión de la forma neutra ( $\lambda_{em} = 370$  nm) con respecto a la forma catiónica ( $\lambda_{em} = 430$  nm), se puede apreciar que tanto en las disoluciones dializadas como en las no dializadas se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia a medida que se incrementa la concentración de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en el medio. Este comportamiento se explica considerando el desplazamiento favorable del equilibrio de inclusión a medida que aumenta la concentración de ciclodextrina en la disolución, favoreciéndose de esta manera la inclusión de las formas neutras. Si se compara la relación de intensidades obtenidas para las disoluciones no dializadas con respecto a las dializadas, se observa que la relación de intensidades es más

elevada en el caso de las disoluciones dializadas. Así, para un valor de concentración de ciclodextrina de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, la relación de intensidades para las disoluciones no dializadas es de 0,421 mientras que para las disoluciones dializadas es de 0,551, es decir, la intensidad de emisión debida a la forma catiónica es aproximadamente el doble que para la forma neutra. Sin embargo, la intensidad de emisión crece mucho más significativamente para la forma neutra que para la forma catiónica a medida que aumenta la concentración de ciclodextrina. En consecuencia, cuando la concentración de ciclodextrina en el medio es  $1,0 \times 10^{-2}$  M, la relación de intensidades es 0,798 para las disoluciones no dializadas y 1,700 para las disoluciones dializadas. Este hecho indica que si bien en el caso de las disoluciones no dializadas se produce un aumento paulatino de la emisión de la forma neutra, sin embargo, continúa siendo mayoritaria la emisión debida al catión, ya que la relación de intensidades se mantiene en un valor inferior a la unidad. En el caso de las disoluciones dializadas, la relación de intensidades supera la unidad, lo cual quiere decir que la emisión de la forma neutra es mayoritaria con respecto a la forma catiónica. Considerando que la aparición de la emisión correspondiente a la forma neutra en disolución acuosa es una demostración de la existencia de los complejos de inclusión, podemos afirmar que el proceso de diálisis es lo suficientemente eficaz como para permitir la determinación cuantitativa de parámetros que sirven para la caracterización de los complejos de inclusión (constantes de asociación o estequiometría) sin la interferencia debida a la emisión de la banda catiónica.

La utilización de esta sencilla pero laboriosa metodología ha resultado ser extraordinariamente valiosa en la determinación de la estequiometría de los complejos de inclusión con diferentes ciclodextrinas (21). Así, para los cálculos estequiométricos se ha empleado el método de Job o de las variaciones continuas; lo cual supone que las concentraciones de harmano y ciclodextrina varían pero se mantiene fija la suma de las concentraciones de ambos en un valor predeterminado, en nuestro caso  $1,0 \times 10^{-2}$  M. En estos experimentos las concentraciones de harmano y ciclodextrina son muy semejantes y, por tanto, no hay exceso de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina que favorezca la inclusión.

En conclusión, la introducción del proceso de diálisis resulta imprescindible a fin de separar los complejos de inclusión de las formas libres de harmano y, de esta manera, facilitar su cuantificación.

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) BROSSI, A.; MAMMALIAN ALKALOIDS II, en CORDEL, G.A. (1993) *The Alkaloids Chemistry and Pharmacology*, vol. 43, Academic Press Inc., San Diego.
- (2) AIRAKSINEN, M.M.; KARI, I. (1981) *Med. Biol.*, 59: 21-34.
- (3) MATSUBARA, K.; FUKUSHIMA, F.; AKANE, A.; HAMA, K.; FIKUI, Y. (1986) *Alcohol Alcohol.*, 21: 339-344.
- (4) SAEED, S.A.; SIMJEE, R.U.; FARNAZ, S.; GILANI, A.H.; SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B.S.; BEGUM, S.; FAIZI, S.; ZIA, A. (1993) *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 461S-462S.
- (5) YAMASHITA, K.; OHGAKI, H.; WAKABAYASHI, K.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T. (1988) *Cancer Lett.*, 42: 179-183.
- (6) NAKAYASU, M.; NAKASATO, F.; SAKAMOTO, H.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. (1983) *Cancer Lett.*, 42: 249-255.
- (7) SZEJTLI, J. (1982) *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Academiai Kiado, Budapest.
- (8) PITHA, J. (1981) *Life Sci.*, 29: 307-311.
- (9) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LERNER, D.A.; MENÉNDEZ, J.C. (2002) *Anal. Chim. Acta*, 468: 161-170.
- (10) NAKAI, Y.; YAMAMOTO, K.; TERADA, K.; AKIMOTO, K. (1984) *Chem. Pharm. Bull.*, 32: 685-691.
- (11) MØLLGAARD ANDERSEN, F.; BUNDGAARD, M. (1982) *Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed.*, 10: 80-87.
- (12) HAMADA, Y.; NAMBU, N.; NAGAI, T. (1975) *Chem. Pharm. Bull.*, 23: 1205-1211.
- (13) MØLLGAARD ANDERSEN, F.; BUNDGAARD, H. (1984) *Int. J. Pharm.*, 19: 189-197.
- (14) RAJAGOPALAN, N.; CHEN, S.C.; CHOW, W.S. (1984) *Int. J. Pharm.*, 29: 161-168.
- (15) MARTÍN, L.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. (1997) *Analyst*, 122: 45-49.
- (16) BALÓN, M., HIDALGO, J., GUARDADO, P., MUÑOZ, M.A., CARMONA, C. (1993) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 99-104.
- (17) FRANKEWICH, R.P.; THIMMAIAH, K.N.; HINZE, W.L. (1991) *Anal. Chem.*, 63: 2924-2933.
- (18) SBAI, M.; AIT-LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. (1995) *Anal. Chim. Acta*, 303: 47-55.
- (19) SBAI, M.; AIT-LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. (1997) *J. Fluorescence*, 7: 7S-10S.
- (20) SBAI, M.; AIT-LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. (1996) *Analyst*, 121: 1561-1564.
- (21) MARTÍN, L.; LEÓN, A.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. (2003) *Talanta*, 60: 493-503.